

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

VICTOR RAMOS GOULART

**EFEITOS DA ADIÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO (H_3PO_4) NO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE
SÊMEN EQUINO**

PORTO ALEGRE

2024/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**EFEITOS DA ADIÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO (H₃PO₄) NO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE
SÊMEN EQUINO**

Autor: Victor Ramos Goulart
Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária como
requisito parcial para a obtenção da graduação em
Medicina Veterinária
Orientador: Henrique Boll De Araujo Bastos
Coorientador: Verônica La Cruz Bueno

**PORTO ALEGRE
2024/1**

CIP - Catalogação na Publicação

Goulart, Victor Ramos
EFEITOS DA ADIÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO (H₃PO₄) NO
DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO / Victor
Ramos Goulart. -- 2024.

50 f.

Orientador: Henrique Boll De Araujo Bastos.

Coorientadora: Verônica La Cruz Bueno.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Porto
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Sêmen Equino Refrigerado. 2. Efeitos adição
ácido fosfórico . I. Bastos, Henrique Boll De Araujo,
orient. II. Bueno, Verônica La Cruz, coorient. III.
Título.

VICTOR RAMOS GOULART

**EFEITOS DA ADIÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO (H₃PO₄) NO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE
SÊMEN EQUINO**

Aprovado em 23/08/2024

APROVADO POR:

Prof. Dr. Henrique Boll De Araujo Bastos
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Verônica La Cruz Bueno
Coorientador

Prof. Dr. Fernando Caetano De Oliveira
Membro da Comissão

Dr. Giovani Casanova Camozzato
Membro da Comissão

Dedico este trabalho a minha mãe Roselaine,
minha avó Maria, que sempre me incentivaram
a seguir em frente, e a duas estrelinhas, meu
pai Vitor e meu avô Germano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora, por ter me dado à vida e me permitir ter saúde para chegar até aqui.

A minha mãe Roselaine e minha avó Maria, por sempre terem me dado todo apoio e condições para que eu pudesse correr atrás deste sonho de criança, que por muitas vezes se tornou difícil durante as inúmeras adversidades que a minha nos pregou, mas que mesmo assim nunca me deixaram desistir deste sonho, que está tão perto de se tornar realidade. Este diploma não vai ser só meu, e sim nosso !!

Ao meu falecido pai Vitor e meu falecido avô Germano, meu muito obrigado por terem me ensinado o valor e o caráter de um homem, esse título também vai a vocês, pois inúmeras vezes me deparei pensando em desistir, e mesmo vocês não estando aqui presentes, me deram forças para seguir em frente, a vontade de dar esse orgulho para vocês foi meu combustível inúmeras vezes, pois só nós sabíamos o quanto este momento foi sonhado, e sei que onde quer que ambos estejam, devem estar feliz com esta realização.

A minha namorada Larissa, que me acompanhou durante esta longa jornada que foi a veterinária, desde a época do cursinho pré-vestibular, sempre do meu lado me incentivando e com pensamentos positivos de que tudo iria dar certo. Agradeço-te por ser um pilar tão importante em minha vida, estando do meu lado em momentos tão delicados como esses que passamos recentemente, sempre me incentivando e apoiando que eu não desistisse deste sonho, fazendo o possível e o impossível para me ajudar. Te amo demais, e jamais vou conseguir agradecer por tudo que já fez e tem feito por mim e pela minha família.

Ao meu primo Gabriel, que é meu irmão de outra mãe, irmão que não tive, mas que sempre esteve ao meu lado, parceiro de tantas indias, que compartilhamos inúmeros sonhos de crianças, que aos poucos vão se tornando realidade.

Ao meu orientador Dr. Henrique Bastos, por todo apoio e empenho para realização não só deste trabalho, como nos anos de estágio no REPROLAB.

A minha coorientadora Dra. Verônica Bueno, que desde o meu ingresso no REPROLAB vem me ajudando e dando conselhos em inúmeros momentos de minha vida.

A toda equipe do REPROLAB, professor Dr. Rodrigo Mattos, professor Dr. Gustavo Winter, Gustavo Larentis, Fabiana Castro, Giovani Camozzato e Joel Neves. Aos estagiários antigos e agora médicos veterinários que me ensinaram muito quando ingressei no setor, Leonardo, Bárbara, Sabrina, Dominique e principalmente a Anna Bettina, que foi quem me

apresentou este mundo da reprodução o qual sou apaixonado, sempre incentivando e dando inúmeros conselhos para a vida. E todos os estagiários que continuam agora no setor.

Ao Dr. Frederico Schmitt por ter aberto as portas da central e disponibilizado as amostras para a realização deste experimento.

E por ultimo mais não menos importante a toda a minha família, amigos, professores e animais que tive o privilégio de conviver durante esses anos de graduação e de minha vida.

“Faça o teu melhor na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores para fazer melhor ainda.” Mario Sergio Cortella.

RESUMO

Equinos são selecionados por inúmeros fatores, entre eles desempenho esportivo, características fenotípicas ou genéticas, muitas vezes selecionando fatores indesejáveis para a reprodução. A inseminação artificial com sêmen refrigerado é uma das principais técnicas utilizadas na reprodução equina, porém existe uma grande variação na qualidade seminal utilizadas. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar os efeitos da adição de ácido fosfórico (H_3PO_4) no diluente de refrigeração de sêmen equino. Foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento, foi realizada uma análise de pH, com PHmetro de bancada com compensação de temperatura Kasvi®, comparando o leite desnatado UHT, com um diluente comercial (Botusemen®), após a adição de ácido fosfórico (H_3PO_4) nas concentrações de 0,015%, 0,03% e 0,06% em ambos os grupos. No segundo experimento, foram realizadas 12 coletas de seis garanhões férteis, da raça crioula. Os ejaculados foram divididos em quatro grupos, Grupo Controle, diluído somente com leite desnatado UHT, e três grupos com adição de ácido fosfórico (H_3PO_4) no leite UHT, nas concentrações de 0,015% (T1), 0,03% (T2) e 0,06% (T3). As análises foram realizadas às 3h, 24h e 48h após diluição, e incluíram avaliações dos padrões do CASA (Computer Assisted Sperm Analysis); teste de hiposmótico e análise morfológica de todos os quatro grupos. A comparação entre os diluentes demonstrou que o botusemen apresentou valores inferiores de pH de 5,48; 5,08; 4,6, comparado aos valores do leite desnatado UHT pH = 6,34; 6,33; 6,1. Houve uma redução significativa da motilidade total, motilidade progressiva, motilidade progressiva rápida, motilidade progressiva lenta, velocidade curvilínea, velocidade em linha reta, velocidade da trajetória média, frequência de batimento do flagelo e amplitude do deslocamento lateral de cabeça, no grupo T3 nos três diferentes tempos de análise, comparando com o Grupo Controle, T1 e T2. O Grupo T1 não apresentou diferenças em relação ao Grupo Controle em nenhum dos diferentes tempos de refrigeração estudados. Em conclusão a adição de ácido fosfórico (H_3PO_4) na concentração de 0,015% (T1), não foi deletéria para o sêmen equino, mais estudos são necessários para avaliação dos índices de fertilidade após a adição de ácido fosfórico.

Palavras-chave: Sêmen, biomarcador, fertilidade, refrigeração, criopreservação, equinos, garanhões, ácido fosfórico, ácido orto-fosfórico, H_3PO_4 , leite desnatado UHT.

ABSTRACT

Equines are selected based on numerous factors, including sports performance, phenotypic or genetic characteristics, often selecting undesirable factors for reproduction. Artificial insemination with cooled semen is one of the main biotechnologies used in equine reproduction, but there is great variation in the seminal quality used. The aim of this research was to evaluate the effects of adding phosphoric acid (H₃PO₄) to the cooling extender of equine semen. Two experiments were carried out. In the first experiment, a pH analysis was performed using a bench pH meter with Kasvi® temperature compensation, comparing UHT skim milk with a commercial extender (Botusemen®) after the addition of phosphoric acid (H₃PO₄) at concentrations of 0.015%, 0.03%, and 0.06% in both groups. In the second experiment, 12 collections were carried out from six fertile stallions of the Criollo breed. The ejaculates were divided into four groups: Control Group, diluted only with UHT skim milk, and three groups with the addition of phosphoric acid (H₃PO₄) in UHT milk at concentrations of 0.015% (T1), 0.03% (T2), and 0.06% (T3). Analyses were performed at 3h, 24h, and 48h after dilution and included assessments of CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) parameters; hypoosmotic test and morphological analysis of all four groups. Comparison between extenders showed that Botusemen presented lower pH values of 5.48; 5.08; 4.6, compared to UHT skim milk values pH = 6.34; 6.33; 6.1. There was a significant reduction in total motility, progressive motility, rapid progressive motility, slow progressive motility, curvilinear velocity, straight line velocity, average path velocity, flagellar beat frequency, and amplitude of lateral head displacement in group T3 at the three different analysis times compared to the Control Group, T1, and T2. Group T1 showed no differences compared to the Control Group at any of the different cooling times studied. In conclusion, the addition of phosphoric acid (H₃PO₄) at a concentration of 0.015% (T1) was not detrimental to equine semen; further studies are needed to evaluate fertility rates after the addition of phosphoric acid.

Keywords: Semen, biomarker, fertility, refrigeration, cryopreservation, equines, stallions, phosphoric acid, orthophosphoric acid, H₃PO₄, UHT skimmed milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Delineamento experimental, esquema ilustrando os processos da análise de sêmen.	28
Figura 2 – Avaliação macroscópica realizada aos 10 minutos após a adição das diferentes concentrações de H ₃ PO ₄	29
Figura 3 – Boxplot dos resultados de Motilidade Total (A), Motilidade Progressiva (B), Motilidade Rápida (C) e Motilidade Local (D), da análise realizada três horas após a diluição do sêmen equino, com diferentes concentrações de H ₃ PO ₄	30
Figura 4 – Boxplot dos resultados de Motilidade Total (A), Motilidade Progressiva (B), Motilidade Rápida (C) e Motilidade Local (D), da análise realizada vinte e quatro horas após a diluição do sêmen equino, com diferentes concentrações de H ₃ PO ₄	31
Figura 5 – Boxplot dos resultados de Motilidade Total (A), Motilidade Progressiva (B), Motilidade Rápida (C) e Motilidade Local (D), da análise realizada quarenta e oito horas após a diluição do sêmen equino, com diferentes concentrações de H ₃ PO ₄	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão dos grupos Controle, T1, T2 e T3, da análise realizada três horas após a diluição do sêmen equino, com diferentes concentrações de H ₃ PO ₄	33
Tabela 2 - Média e desvio padrão dos grupos Controle, T1, T2 e T3, da análise realizada vinte e quatro horas após a diluição do sêmen equino, com diferentes concentrações de H ₃ PO ₄	33
Tabela 3 - Média e desvio padrão dos grupos Controle, T1, T2 e T3, da análise realizada quarenta e oito horas após a diluição do sêmen equino, com diferentes concentrações de H ₃ PO ₄	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (μm)
ATP	adenosina trifosfato
B	Botusemen
BCF	Frequência de Batimentos do Flagelo (Hz)
CASA	Análise de sêmen assistida por computador
DNA	Ácido desoxirribonucleico
h	Horas
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
Hz	Hertz
LIN	Linearidade (%)
L	Leite desnatado UHT
m ²	Metros quadrados
ml	Mililitro
ML	Motilidade Local (%)
MP	Motilidade Progressiva (%)
MR	Motilidade Rápida (%)
MT	Motilidade Total (%)
P	Probabilidade
pH	Potencial hidrogeniônico
P _{pi}	Pirofosfato inorgânico
REPROLAB	Laboratório de reprodução animal
RS	Rio Grande do Sul
s	Segundos
S	Sul
STR	Retilinearidade (%)
SPZ	Espermatozoides
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UHT	Tratamento ultra térmico
VAP	Velocidade de Trajeto ($\mu\text{m/s}$)
VCL	Velocidade Curvilínea ($\mu\text{m/s}$)
VSL	Velocidade em linha reta ($\mu\text{m/s}$)

W	Oeste
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor que
%	Porcentagem
\$	Cifrão
°	Graus
=	Igual
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 ARTIGO CIENTÍFICO.....	22
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a equinocultura é praticada em todo o mundo com diversos objetivos, que variam desde o negócio até o trabalho agropecuário. O efetivo mundial de equinos é estimado em 60.566.601 cabeças, das quais cerca de 54% encontra-se nas Américas, onde o Brasil está na quarta posição dos maiores rebanhos de equinos no mundo (Canton, 2021). Movimentado mais de R\$30 bilhões anualmente em diversos setores (Rural, 2023), gerando em torno de 610 mil empregos diretos e 2.43 milhões de empregos indiretos (MAPA, 2016).

Diferente de outras espécies domésticas de interesse zootécnico, os equinos são valorizados como indivíduos, podendo chegar a valores elevados, dependendo da sua genética ou resultados dentro de pistas, deixando de lado parâmetros reprodutivos (Sieme; Distl, 2012). Éguas e garanhões são selecionados para a reprodução através do pedigree, desempenho esportivo e conformação racial (Varner *et al.*, 2008), muitas vezes selecionando negativamente fatores indesejáveis, levando a índices reprodutivos baixos. Dentro da equação da reprodução, os garanhões representam 50% da mesma, onde se encontram garanhões de fertilidade baixa, levando a resultados indesejáveis dentro da criação de equinos (Varner *et al.*, 2008). As biotecnologias da reprodução se colocam como uma importante ferramenta a serviço da equideocultura mundial, como instrumento direto do melhoramento genético, uma vez que são utilizadas para aumentar a produção de potros (Hinrichs, 2013). Mesmo garanhões com qualidades seminais boas e similares, tendem a variar a sua fertilidade, neste contexto inúmeros métodos laboratoriais vêm sendo utilizados para avaliação de sêmen, dentre eles, as análises computadorizadas do movimento (CASA), morfologia espermática, composição do plasma seminal, integridade da membrana plasmática e acrossomal, função mitocondrial, desnaturação da cromatina, peroxidação das membranas espermáticas, entre outros (Arruda *et al.*, 2007).

Os parâmetros tradicionais para a avaliação de amostras de sêmen incluem concentração, volume (Arruda *et al.*, 2007; Perreault, 2009), motilidade e morfologia espermática (Arruda *et al.*, 2007; Varner, 2008), sendo usualmente, a motilidade espermática estimada através da análise do sêmen entre lâmina e lamínula, enquanto que a morfologia espermática é examinada em esfregaço corado, ambos utilizando microscopia óptica (Arruda *et al.*, 2007). No entanto, estudos indicam que essas técnicas manuais de análise são imprecisas, inexatas e sujeitas a variações, mesmo quando realizadas por operadores experientes, com isso, a análise de imagens computadorizada tem sido bastante difundida, buscando uma técnica que ofereça maior repetibilidade e confiabilidade (Arruda *et al.*, 2007).

A análise de sêmen assistida por computador (CASA) foi introduzida tanto para humanos quanto para espécies animais há cerca de duas décadas (Verstegen; Iguer-ouada; Onclin, 2002). Usando a combinação de um microscópio e uma câmera, as células espermáticas são visualizadas e as trajetórias reais dos espermatozoides analisadas, sendo o reconhecimento adequado das células espermáticas determinado pelas configurações do software (Hoogewijs *et al.*, 2011). Esses sistemas produzem dados precisos e altamente repetíveis de diferentes parâmetros de motilidade do sêmen em diferentes espécies (Verstegen; Iguer-ouada; Onclin, 2002). A avaliação computadorizada da motilidade espermática é de grande interesse devido ao fato da cinética espermática ter uma boa relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (Arruda *et al.*, 2007). Sendo a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular relacionados com penetração no muco cervical, penetração em oócitos de hamster e resultados de fertilização *in vitro* (Centola, 1996; Januskauskas *et al.*, 1999).

A análise da morfologia dos espermatozoides é uma parte importante da avaliação de aptidão reprodutiva de garanhões, uma vez que fornece uma medida objetiva da qualidade do sêmen do garanhão e é um dos inúmeros fatores que estimam o potencial de fertilidade do garanhão (Hernández-avilés *et al.*, 2023). A estrutura e o tamanho dos espermatozoides influenciam seu funcionamento correto, incluindo sua capacidade de reação acrossômica (Maree *et al.*, 2010) e ligação com a zona pelúcida do oócito (Garrett; Liu; Baker, 1997), afetando assim o potencial de fertilidade do macho (Menkveld *et al.*, 2003). As características morfológicas dos espermatozoides de garanhões foram descritas visualmente com microscópio óptico e são semelhantes às de outros animais domésticos, uma exceção é que uma fixação abaxial da cauda é comumente observada em garanhões (Jasko, 1992).

A avaliação da morfologia dos espermatozoides consiste em determinar a porcentagem de espermatozoides com estrutura morfológica defeituosa e a proporção de espermatozoides com defeitos maiores ou menores (Menkveld, 2010). Sendo defeitos maiores, qualquer tipo de anomalia relacionada à redução da fertilidade, incluindo: formas duplas, Knobbed sperm, decapitado, diadema, piriforme, estreito na base, contorno anormal, cabeça pequena anormal, cabeça destacada anormal, peça intermediária em saca-rolhas, outros defeitos de peça intermediária, gota proximal, cauda fortemente dobrada ou enrolada. E defeitos menores, outros desvios de forma que aparentemente não causavam tanto impacto na fertilidade, como: como cabeça delgada, cabeça pequena normal, cabeça gigante, curta e achatada, cabeça normal destacada, acrossomo destacado, inserção abaxial, gota distal, cauda dobrada ou enrolada, e cauda enrolada na extremidade (Blom, 1972). Posteriormente se classificou em

alterações compensáveis, que seriam as patologias que poderiam ser resolvidas aumentando a dose inseminante, e alterações não compensáveis, as quais há incapacidade de fecundação ou de nascimento de produtos viáveis (Saacke *et al.*, 2008). A morfologia ou estrutura dos espermatozoides é tipicamente examinada com um microscópio óptico a 1000 vezes de ampliação, onde pelo menos 100 espermatozoides devem ser avaliados quanto à evidência de defeitos morfológicos. As anormalidades na morfologia dos espermatozoides tradicionalmente são classificadas como primárias, secundárias ou terciárias. As anormalidades primárias são consideradas associadas a um defeito na espermatogênese e, portanto, têm origem testicular; as anormalidades secundárias são criadas no sistema de ductos excretores; e as anormalidades terciárias, ao contrário das duas anteriores, desenvolvem-se *in vitro* como resultado de coleta inadequada ou procedimentos de manejo. A percentagem de espermatozoides morfolologicamente normais está correlacionada positivamente com a motilidade espermática (Varner, 2008).

Como a membrana espermática é de fundamental importância no processo de fertilização, testes foram criados para verificar a funcionalidade desta membrana. O teste de inchamento hiposmótico avalia se uma membrana intacta é funcional, expondo o sêmen a uma solução hiposmótica, espermatozoides funcionais incham para estabelecer o equilíbrio osmótico, produzindo o típico inchaço da cauda, uma vez que a fertilização não ocorrerá se a membrana espermática estiver bioquimicamente inativa, mesmo que permaneça estruturalmente intacta (Neild *et al.*, 1999).

O pH do ejaculado equino varia entre 6,8 e 7, o qual pode ser influenciado pela estação do ano, frequência de coletas/coberturas e concentração espermática, sendo tolerado diluentes que se encaixem nesta faixa, sem sofrer efeitos prejudiciais (Trentin, 2024). A manutenção do pH do diluente no qual os espermatozoides estão suspensos é um aspecto crucial na preservação do sêmen (Yániz; Mateos; Santolaria, 2011). Pois o pH do meio está correlacionado com a motilidade e viabilidade dos espermatozoides (Jones; Bavister, 2000). Wendt *et al.* (2002), demonstrou em um estudo o efeito do pH do diluente sobre a motilidade do sêmen armazenado a 5°C por 24 horas, mostrando que não há diferença na motilidade progressiva de sêmen fresco em pH na faixa de 6,4-7,4 .

Uma alta porcentagem de garanhões (20 a 40%) tem sêmen que responde mal ao congelamento (Vidament *et al.*, 1997), sendo necessária a utilização de sêmen resfriado para transporte (Batellier *et al.*, 1998). Altas concentrações de plasma seminal no sêmen resfriado de garanhões são prejudiciais à motilidade e fertilidade do sêmen (Pickett *et al.*, 1975; Jasko *et al.*, 1992). O dano ao DNA aumenta à medida que os níveis de plasma seminal e o tempo

de armazenamento se elevam, indicando que o plasma seminal contém fatores que prejudicam o DNA espermático (Love, 2005). A diminuição da qualidade do sêmen durante armazenamento refrigerado pode ser reduzida pela diluição com um diluente adequado (Aurich, 2005). Diluentes à base de leite são comumente usados nos Estados Unidos (Brinsko, 2011) e Europa (Aurich, 2011) para transportar sêmen refrigerado de garanhões. Sendo conhecidos por serem práticos e eficazes na preservação e armazenamento de sêmen equino (Batellier *et al.*, 1998; Pagl *et al.*, 2006; Recková *et al.*, 2022). Além da diluição do plasma seminal, os efeitos positivos do diluente são baseados no controle do pH, osmolaridade e fornecimento de energia (Pagl *et al.*, 2006). Sendo a composição do diluente um dos principais fatores que afetam a qualidade do ejaculado (Pagl *et al.*, 2006; Lefrapper; Walston; Whisnant, 2010).

O leite é um fluido biológico com composição complexa e contém componentes que são benéficos aos espermatozoides (Batellier *et al.*, 1998). O leite desnatado pode ser uma alternativa para reduzir custos associados à produção de doses inseminantes (Freitas *et al.*, 2014). As micelas de caseína presentes no leite são componentes ativos que atuam como protetores do sêmen (Bergeron; Manjunath, 2006). O mecanismo de proteção do sêmen baseia-se na ligação às proteínas do plasma seminal e na redução da perda lipídica da membrana do espermatozóide durante o armazenamento do sêmen (Manjunath, 2018). Os diluentes à base de leite têm um efeito positivo na atividade antioxidante do sêmen diluído (Kankofer *et al.*, 2005).

Os diluentes mais bem-sucedidos usados com sêmen de garanhão para inseminação artificial contém leite desnatado (Michajilov, 1950; Kenney *et al.*, 1976; Palmer, 1984; Batellier *et al.*, 2001). Em estudos anteriores, foi testada a qualidade do sêmen após o uso de leite desnatado e diluentes disponíveis comercialmente com composição quimicamente definida: Equi Pro, Equi Plus, INRA 96 e BotuSemen Gold (Recková *et al.*, 2022), mostrando que os diluentes à base de leite desnatado, INRA 96 e BotuSemen Gold obtiveram melhores resultados, apresentando melhores desempenhos comparando a alguns dos novos diluentes (Mamica; Havlickova; Recková, 2019). A inseminação artificial é uma técnica amplamente utilizada que visa aumentar a eficiência reprodutiva, no entanto, o sucesso da reprodução artificial depende de uma série de fatores, entre eles, o armazenamento eficiente dos espermatozoides (Ghorbani *et al.*, 2024). Doses de sêmen refrigeradas são utilizadas com mais frequência do que as congeladas e apresentam melhores indicadores de capacidade de inseminação do sêmen utilizado (Kowalczyk; Czerniawska-piatkowska; Kuczaj, 2019).

Segundo Silva *et al.* (2012), há um aumento significativo na ligação do espermatozóide à zona pelúcida do ovócito, quando é utilizado diluentes à base de leite desnatado, observando também um aumento de três vezes na ligação dos espermatozóides à zona pelúcida quando diluídos em leite desnatado em comparação com diluentes, que não continham leite. Em experimentos anteriores, se constatou uma correlação da capacidade de ligação dos espermatozóides à zona pelúcida, com a fertilidade de touros (Fazeli *et al.*, 1993), suínos (Ivanova; Mollova, 1993; Braundmeier *et al.*, 2004) e garanhões (Fazeli *et al.*, 1995; Pantke *et al.*, 1995; Meyers *et al.*, 1996).

Vários tipos de recipientes são utilizados para o transporte do sêmen, entre os quais as caixas descartáveis de poliestireno, de baixo custo, têm ganhado popularidade nos últimos anos, onde o sêmen diluído é resfriado lentamente até alcançar uma temperatura final de 4°C à 10°C (Katila, 2011). O metabolismo dos espermatozóides à temperatura corporal é muito elevado e produz muitos produtos de resíduos, levando à perda da integridade celular, motilidade e viabilidade (Graham, 2011). Reduzindo a temperatura para 4°C, o metabolismo diminui para apenas 7% em relação à temperatura corporal (Graham, 2011). O sêmen da maioria dos garanhões sobrevive ao procedimento padrão de resfriamento até 4°C e mantém um bom nível de fertilidade por 48 a 72 horas se mantido a essa temperatura (Heiskanen *et al.*, 1994; Katila, 2011; Graham, 2011).

A metabolômica é uma técnica emergente e tem mostrado promessas na identificação de potenciais biomarcadores de fertilidade e infertilidade masculina (Goodacre *et al.*, 2004; Kovac; Pastuszak; Lamb, 2013; Kumar *et al.*, 2015 Bieniek; Drabovich; Lo, 2016). Sendo usadas para identificar potenciais biomarcadores de fertilidade no plasma seminal de touros (Kumar *et al.*, 2015), homens (Hamamah *et al.*, 1993; Hamamah *et al.*, 1998; Deepinder; Chowdary; Agarwal, 2007; Kovac; Pastuszak; Lamb, 2013; Gilany *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2017; Gilany *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017) e garanhões (Wood *et al.*, 2016), porém há um número limitado de tais estudos em animais. Segundo Velho *et al.*, (2018), o ácido fosfórico (H₃PO₄) é um dos cinco metabólitos mais predominantes no plasma seminal de touros, estando associado a menores índices de fertilidade nos touros Holandeses. O H₃PO₄ contribui para o metabolismo energético do espermatozóide, sendo produzido pela quebra de uma molécula de pirofosfato inorgânico (PPi). Esse processo libera energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), que pode ser utilizada para a motilidade espermática e para a função do acrossomal durante a penetração na zona pelúcida (Wallach; Revel, 1980; Lundin; Baltscheffsky; Ronne, 1991; Velho *et al.*, 2018). Além disso, o fosfato inorgânico resultante da hidrólise de ATP afeta positivamente tanto a motilidade quanto a capacidade fertilizante do

espermatozoide humano (Fakih *et al.*, 1986). Assim, níveis elevados de fosfato inorgânico nos espermatozoides de touros podem ser necessários para manter o status de motilidade dos espermatozoides e alcançar fertilidade normal (Menezes *et al.*, 2019).

Segundo Bueno (2023), dentre os dezoito metabólitos encontrados nas amostras de plasma seminal de garanhões, em um estudo de metabolômica, o H_3PO_4 se demonstrou maior no grupo com altas taxas de prenhez, demonstrando também uma correlação positiva com integridade funcional, integridade física, fertilidade, motilidade progressiva, motilidade total, VCL, VSL, VAP, linearidade, BCF, ALH, volume total do ejaculado e proteína total/ejaculado. Ishigaki; Hoshino; Ozaki (2019), também relataram que oócitos na Fase II, com alta fertilidade e viabilidade, tinham altas concentrações de ácidos fosfóricos.

O H_3PO_4 ou ácido ortofosfórico, é um ácido trivalente, com três hidrogênios ácidos, usado na fabricação de fertilizantes, sais de fosfato, polifosfatos, detergentes, carvão ativado, ração animal, cerâmicas, cimento dentário, produtos farmacêuticos, refrigerantes, gelatina, inibidores de ferrugem, cera e látex de borracha (Von, 1992; Johnson *et al.*, 2021). Sendo usado como ajustador de pH em cosméticos (Johnson *et al.*, 2021), acidificante de alimentos como refrigerantes e xaropes (Moraes, 2015), usado como fonte vital de fósforo em fertilizantes, sendo um dos três nutrientes principais necessários para o crescimento das plantas (Hignett, 1985). É o principal ácido inorgânico utilizado em alimentos, pois tem como característica um custo muito baixo, sendo um ácido forte cujo valor do pH é o menor de todos os acidulantes, justificando-se assim sua ampla utilização na indústria (Baruffaldi; Oliveira, 1998).

O H_3PO_4 desempenha um papel importante na fertilidade masculina, ao participar de reações químicas e bioquímicas importantes para o armazenamento e liberação de energia. Sendo considerado um biomarcador de qualidade seminal e fertilidade em garanhões (Bueno, 2023).

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Nesta seção será apresentado o artigo que será submetido à Revista Acta Scientiae Veterinarie.

EFEITOS DA ADIÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO (H₃PO₄) NO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO

V.R.GOULART, L.L.SANTOS, F.L.SCHMITT, V.L.C.BUENO, H.B.A.BASTOS

FACULDADE DE VETERINÁRIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS),
PORTO ALEGRE, BRASIL.

RESUMO

Equinos são selecionados por inúmeros fatores, entre eles desempenho esportivo, características fenotípicas ou genéticas, muitas vezes selecionando fatores indesejáveis para a reprodução. A inseminação artificial com sêmen refrigerado é umas das principais biotécnicas utilizadas na reprodução equina, porém existe uma grande variação na qualidade seminal utilizadas. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar os efeitos da adição de ácido fosfórico (H₃PO₄) no diluente de refrigeração de sêmen equino. Foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento, foi realizado uma análise de pH, com PHmetro de bancada com compensação de temperatura Kasvi®, comparando o leite desnatado UHT, com um diluente comercial (Botusemen®), após a adição de ácido fosfórico (H₃PO₄) nas concentrações de 0,015%, 0,03% e 0,06% em ambos os grupos. No segundo experimento, foram realizadas 12 coletas de seis garanhões férteis, da raça crioula. Os ejaculados foram divididos em quatro grupos, Grupo Controle, diluído somente com leite desnatado UHT, e três grupos com adição de ácido fosfórico (H₃PO₄) no leite UHT, nas concentrações de 0,015% (T1), 0,03% (T2) e 0,06% (T3). As análises foram realizadas às 3h, 24h e 48h após diluição, e incluíram avaliações dos padrões do CASA (Computer Assisted Sperm Analysis); teste de hiposmótico e análise morfológica de todos os quatro grupos. A comparação entre os diluentes demonstrou que o botusemen apresentou valores inferiores de pH de 5,48; 5,08; 4,6, comparado aos valores do leite desnatado UHT pH = 6,34; 6,33; 6,1. Houve uma redução significativa da

motilidade total, motilidade progressiva, motilidade progressiva rápida, motilidade progressiva lenta, velocidade curvilínea, velocidade em linha reta, velocidade da trajetória média, frequência de batimento do flagelo e amplitude do deslocamento lateral de cabeça, no grupo T3 nos três diferentes tempos de análise, comparando com o Grupo Controle, T1 e T2. O Grupo T1 não apresentou diferenças em relação ao Grupo Controle em nenhum dos diferentes tempos de refrigeração estudados. Em conclusão a adição de ácido fosfórico (H_3PO_4) na concentração de 0,015% (T1), não foi deletéria para o sêmen equino, mais estudos são necessários para avaliação dos índices de fertilidade após a adição de ácido fosfórico.

Palavras-chave: Sêmen, biomarcador, fertilidade, refrigeração, criopreservação, equinos, garanhões, ácido fosfórico, ácido orto-fosfórico, H_3PO_4 , leite desnatado UHT.

ABSTRACT

Equines are selected based on numerous factors, including sports performance, phenotypic or genetic characteristics, often selecting undesirable factors for reproduction. Artificial insemination with cooled semen is one of the main biotechnologies used in equine reproduction, but there is great variation in the seminal quality used. The aim of this research was to evaluate the effects of adding phosphoric acid (H_3PO_4) to the cooling extender of equine semen. Two experiments were carried out. In the first experiment, a pH analysis was performed using a bench pH meter with Kasvi® temperature compensation, comparing UHT skim milk with a commercial extender (Botusemen®) after the addition of phosphoric acid (H_3PO_4) at concentrations of 0.015%, 0.03%, and 0.06% in both groups. In the second experiment, 12 collections were carried out from six fertile stallions of the Criollo breed. The ejaculates were divided into four groups: Control Group, diluted only with UHT skim milk, and three groups with the addition of phosphoric acid (H_3PO_4) in UHT milk at concentrations of 0.015% (T1), 0.03% (T2), and 0.06% (T3). Analyses were performed at 3h, 24h, and 48h after dilution and included assessments of CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) parameters; hypoosmotic test and morphological analysis of all four groups. Comparison between extenders showed that Botusemen presented lower pH values of 5.48; 5.08; 4.6, compared to UHT skim milk values pH = 6.34; 6.33; 6.1. There was a significant reduction in total motility, progressive motility, rapid progressive motility, slow progressive motility, curvilinear velocity, straight line velocity, average path velocity, flagellar beat frequency, and

amplitude of lateral head displacement in group T3 at the three different analysis times compared to the Control Group, T1, and T2. Group T1 showed no differences compared to the Control Group at any of the different cooling times studied. In conclusion, the addition of phosphoric acid (H₃PO₄) at a concentration of 0.015% (T1) was not detrimental to equine semen; further studies are needed to evaluate fertility rates after the addition of phosphoric acid.

Keywords: Semen, biomarker, fertility, refrigeration, cryopreservation, equines, stallions, phosphoric acid, orthophosphoric acid, H₃PO₄, UHT skimmed milk.

INTRODUÇÃO

Ao contrário de outras espécies de produção, os equinos são valorizados como indivíduos, selecionados através de características fenotípicas, desempenho ou genética (Varner *et al.*, 2008), deixando de lado parâmetros reprodutivos (Sieme; Distl, 2012) e muitas vezes selecionando negativamente fatores indesejáveis, levando a índices reprodutivos baixos. Os garanhões contribuem em 50% dentro da equação da reprodução, onde garanhões de baixa fertilidade podem levar a resultados indesejáveis dentro da criação de equinos (Varner *et al.*, 2008). As biotecnologias da reprodução se colocam como uma ferramenta importante dentro da equideocultura mundial, uma vez que são utilizadas para aumentar a produção de potros dentro de uma temporada (Hinrichs, 2013).

De 20 a 40% dos garanhões apresentam sêmen que responde mal à criopreservação (Vidament *et al.*, 1997), sendo necessária a utilização de sêmen resfriado para transporte (Batellier *et al.*, 1998). Altas concentrações de plasma seminal no sêmen resfriado de garanhões são prejudiciais à motilidade e fertilidade do sêmen (Pickett *et al.*, 1975; Jasko *et al.*, 1992). O dano ao DNA aumenta à medida que os níveis de plasma seminal e o tempo de armazenamento se elevam, indicando que o plasma seminal contém fatores que prejudicam o DNA espermático (Love, 2005). A diminuição da qualidade do sêmen durante armazenamento refrigerado pode ser reduzida pela diluição com um diluente adequado (Aurich, 2005). Diluentes à base de leite são comumente usados nos Estados Unidos (Brinsko, 2011) e Europa (Aurich, 2011) para transportar sêmen refrigerado de garanhões. Sendo conhecidos por serem práticos e eficazes na preservação e armazenamento de sêmen equino (Batellier *et al.*, 1998; Pagl *et al.*, 2006; Recková *et al.*, 2022). Além da diluição do plasma

seminal, os efeitos positivos do diluente são baseados no controle do pH, osmolaridade e fornecimento de energia (Pagl *et al.*, 2006).

A metabolômica é uma técnica emergente e tem mostrado promessas na identificação de potenciais biomarcadores de fertilidade no plasma seminal de touros (Kumar *et al.*, 2015), homens (Hamamah *et al.*, 1993; Hamamah *et al.*, 1998; Deepinder; Chowdary; Agarwal, 2007; Kovac; Pastuszak; Lamb, 2013; Gilany *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2017; Gilany *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017) e garanhões (Wood *et al.*, 2016). Recentemente Bueno (2023), relatou que dentre os 18 metabólitos encontrados nas amostras de plasma seminal de garanhões, o ácido fosfórico (H₃PO₄) se demonstrou maior no grupo com altas taxas de prenhez, demonstrando também uma correlação positiva com integridade funcional, integridade física, fertilidade, motilidade progressiva, motilidade total, velocidade curvilínea, velocidade em linha reta, velocidade da trajetória média, linearidade, frequência de batimento de flagelo, amplitude do deslocamento lateral da cabeça, volume total do ejaculado e proteína total/ejaculado, podendo ser um possível marcador para fertilidade equina. Velho *et al.* (2018), encontrou H₃PO₄ entre os cinco metabólitos mais predominantes no plasma seminal de touros. Ishigaki; Hoshino; Ozaki (2019), também relataram que oócitos na Fase II, com alta fertilidade e viabilidade, tinham altas concentrações de ácidos fosfóricos.

O ácido fosfórico contribui para o metabolismo energético do espermatozóide, sendo produzido pela quebra de uma molécula de pirofosfato inorgânico (PPi). Esse processo libera energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), que pode ser utilizada para a motilidade espermática e para a função do acrossomal durante a penetração na zona pelúcida (Wallach; Revel, 1980; Lundin; Baltscheffsky; Ronne, 1991; Velho *et al.*, 2018,). Além disso, o fosfato inorgânico resultante da hidrólise de ATP afeta positivamente tanto a motilidade quanto a capacidade fertilizante do espermatozoide humano (Fakih *et al.*, 1986). Com isso buscamos o aumento compreensão da infertilidade na espécie equina, podendo levar ao desenvolvimento de um produto que aumente as características seminais relacionadas à fertilidade masculina. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar os efeitos da adição de ácido fosfórico (H₃PO₄) no diluente de refrigeração de sêmen equino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Experimento 1

Foi realizada uma aferição de pH com PHmetro de bancada com compensação de temperatura Kasvi® (K39-1420A), de um diluente comercial Botusêmen (Botupharma®, Brasil) e de leite desnatado UHT, in natura e com a adição de diferentes concentrações de ácido fosfórico (H₃PO₄). Foram testados quatro grupos com o Leite Desnatado UHT (L), sendo um Grupo Controle (LC), e os outros três com adição de diferentes concentrações de 0,015% (L1), 0,03% (L2) e 0,06% (L3) de H₃PO₄ cada, repetindo o mesmo processo com o Botusêmen (B), formando os Grupos Controle (BC), 0,015% (B1), 0,03% (B2) e 0,06% (B3). A aferição era feita imediatamente após a adição e homogeneização do H₃PO₄ em todos os grupos e uma avaliação macroscópica foi realizada 10 minutos após a aferição de pH.

Experimento 2

Animais

Foram utilizados seis garanhões da raça crioula entre 8 e 19 anos de idade, pesando entre 450 e 500 Kg. Os garanhões eram alimentados diariamente com concentrado, feno de alfafa, água a vontade e suplementação mineral. Os animais eram alojados na Central de Reprodução Equina SCHIMITT E GONZALES, situada em São Jerônimo (30°S, 51°W) RS, Brasil, de onde foram doadas as amostras de sêmen para a realização deste experimento.

Coleta de Amostras de Sêmen

Dois ejaculados foram coletados de cada garanhão durante a temporada reprodutiva. Todos os garanhões estavam em atividade reprodutiva. As coletas das amostras ocorreram após dois dias de descanso sexual, utilizando uma vagina artificial modelo Botupharma, pré-aquecida (42 – 45°C). Logo após a coleta, o ejaculado foi filtrado através de um filtro de linha Hilter, e realizado uma análise da concentração espermática através do Fotometro SDM1®, sendo doada uma amostra para a realização do experimento, onde posteriormente era dividido em quatro alíquotas, uma alíquota para o grupo controle e outras 3 alíquotas para os grupos tratados, ficando com concentração final de 50X10⁶ spz/ml em cada grupo. O Grupo Controle

foi diluído somente em leite desnatado UHT, e os grupos tratados com suas respectivas concentrações. Os Grupos Tratamentos 1 (T1), 2 (T2) e 3 (T3) tiveram a adição de ácido fosfórico (H₃PO₄) 85% P.A. Neon® na concentração de 0,015%, 0,03% e 0,06% respectivamente, sendo 10 ml de leite desnatado UHT em cada grupo, com a adição de 1,7 µl, 3,4 µl e 6,7 µl de H₃PO₄. As amostras de sêmen foram armazenadas em tubos Falcon® e encaminhadas para o Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, acondicionadas em caixa térmica de poliestireno expandido (Botuflex®) em temperatura ambiente.

Análise do Sêmen

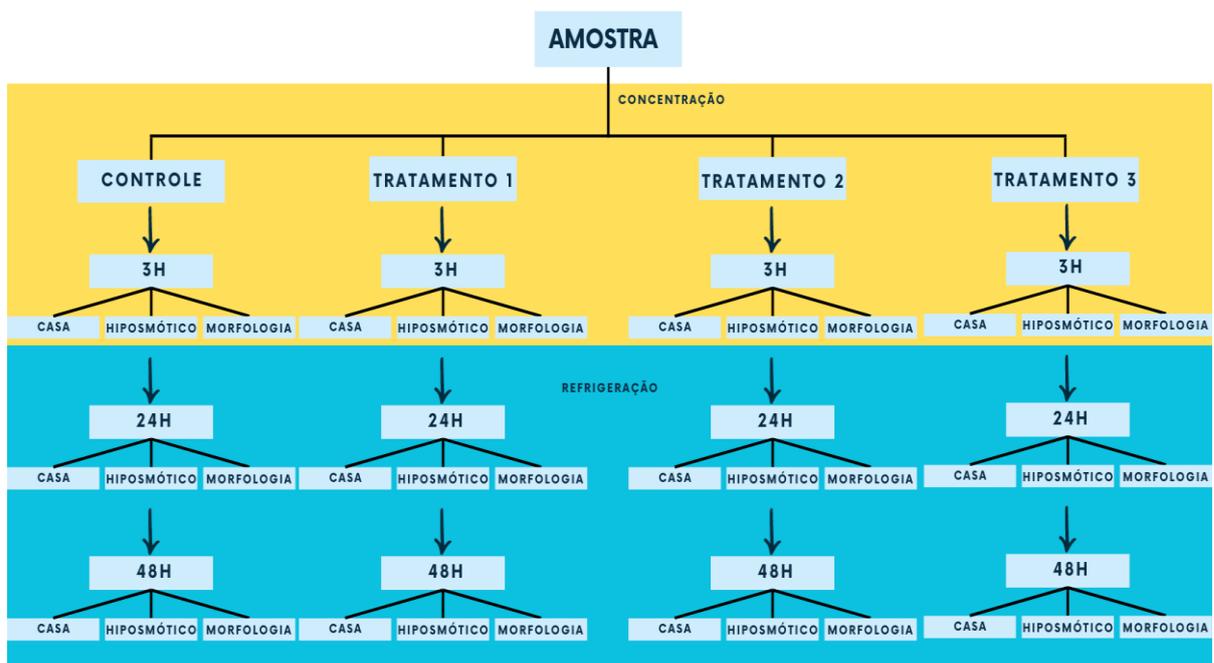
Foram realizadas análises espermáticas 3h, 24h, e 48h após a adição do diluente em todos os grupos (Figura 1). Permanecendo as amostras após a diluição em caixas térmicas de poliestireno expandido (Botuflex®), em temperatura ambiente até o Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária (Reprolab), após a primeira análise, iniciou-se a refrigeração, adicionando dois gelos reutilizáveis na caixa Botuflex®, próprias para o transporte de sêmen refrigerado, permanecendo a 5°C durante a refrigeração.

Em cada momento de análise (3h, 24h e 48h) os tubos Falcon® eram retirados momentaneamente da Botuflex®, onde o sêmen era homogeneizado e posto uma gota de 6 µl da amostra entre lâmina e lamínula previamente aquecidas, as quais permaneciam em mesa aquecida a 37,5° C por quatro minutos, para posterior análise de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), motilidade progressiva rápida (MR, %), motilidade progressiva lenta (ML, %), motilidade local (MC, %), imóveis (IM, %); velocidade da trajetória média (VAP, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %), frequência de batimento do flagelo (BCF, Hz), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm/s), realizadas através do sistema computadorizado CASA (Computer Assisted Sperm Analysis, AndroVision®, Minitube, Tiefenbach, Alemanha). Foi realizada uma média de quatro campos de cada amostra e os padrões utilizados para o ajuste do equipamento foram: 30 imagens/segundo com 60 Hz; tamanho de partícula capturado entre 4 e 75 µm/m²; espermatozoides considerados imóveis <10 µm/s, lentos <45 µm/s, médios de 45 a 80 µm/s e rápidos acima de 80 µm/s.

Foi realizada a análise de integridade funcional da membrana plasmática, sendo avaliada por meio do teste hiposmótico. Para tanto, 200 μ L de água destilada foram adicionados a 100 μ L de sêmen. As amostras foram incubadas a 37°C por oito minutos e posteriormente, analisadas em microscópio de contraste de fase em aumento de 400x. Sendo avaliadas 100 células espermáticas por amostra e considerados íntegros os espermatozoides com enrolamento da cauda (Lagares *et al.*, 1998).

Uma alíquota de semen foi utilizada para realização do esfregaço, para a avaliação da morfologia espermática. Foi utilizado kit panótico® (Laborclin), onde a lâmina com o esfregaço de sêmen foi mergulhada por 10 segundos consecutivamente em cada corante e imediatamente após a secagem, a lâmina foi levada ao microscópio em objetiva de imersão (1000x) para análise, foram contadas 100 células espermáticas de cada amostra (CBRA, 2013).

Figura 1. Delineamento experimental, esquema ilustrando os processos da análise de sêmen.



Análises espermáticas 3h, 24h, e 48h após a adição do diluente em todos os grupos.

Análise Estatística

Foi utilizado o programa GraphPad Prism 10, para realização da análise dos dados. Foram consideradas variáveis independentes o grupo controle e o tratamento 1, 2 e 3. As variáveis dependentes analisadas foram a MT, MP, MR, ML, VCL, VSL, VAP, BCF e ALH. Para análise da normalidade das variáveis dependentes foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk.

Para as variáveis dependentes paramétricas, foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste T de Tukey, e para as variáveis dependentes não paramétricas, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis.

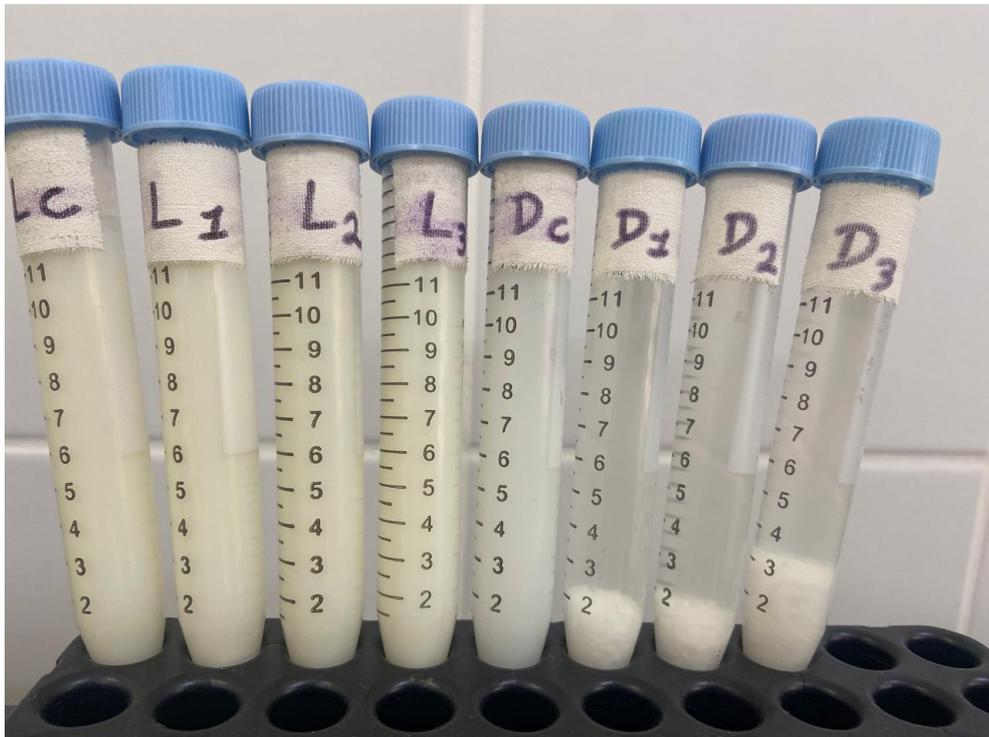
RESULTADOS

Experimento 1

Ao realizar a mensuração do pH dos diluentes no Grupo Controle e nos Grupos com adição de H_3PO_4 , foi observado os respectivos resultados LC = 6,77; L1 = 6,34; L2 = 6,33; L3 = 6,1; BC = 6,75; B1 = 5,48; B2 = 5,08 e B3 = 4,60.

Foi verificado macroscopicamente que no grupo Botusemen após a adição de ácido fosfórico (H_3PO_4) nas concentrações de 0,015%, 0,03% e 0,06%, ocorreu uma rápida aglutinação e precipitação (Figura 2), o que não ocorreu no grupo com Leite UHT .

Figura 2 – Avaliação macroscópica realizada aos 10 minutos após a adição das diferentes concentrações de H_3PO_4 .



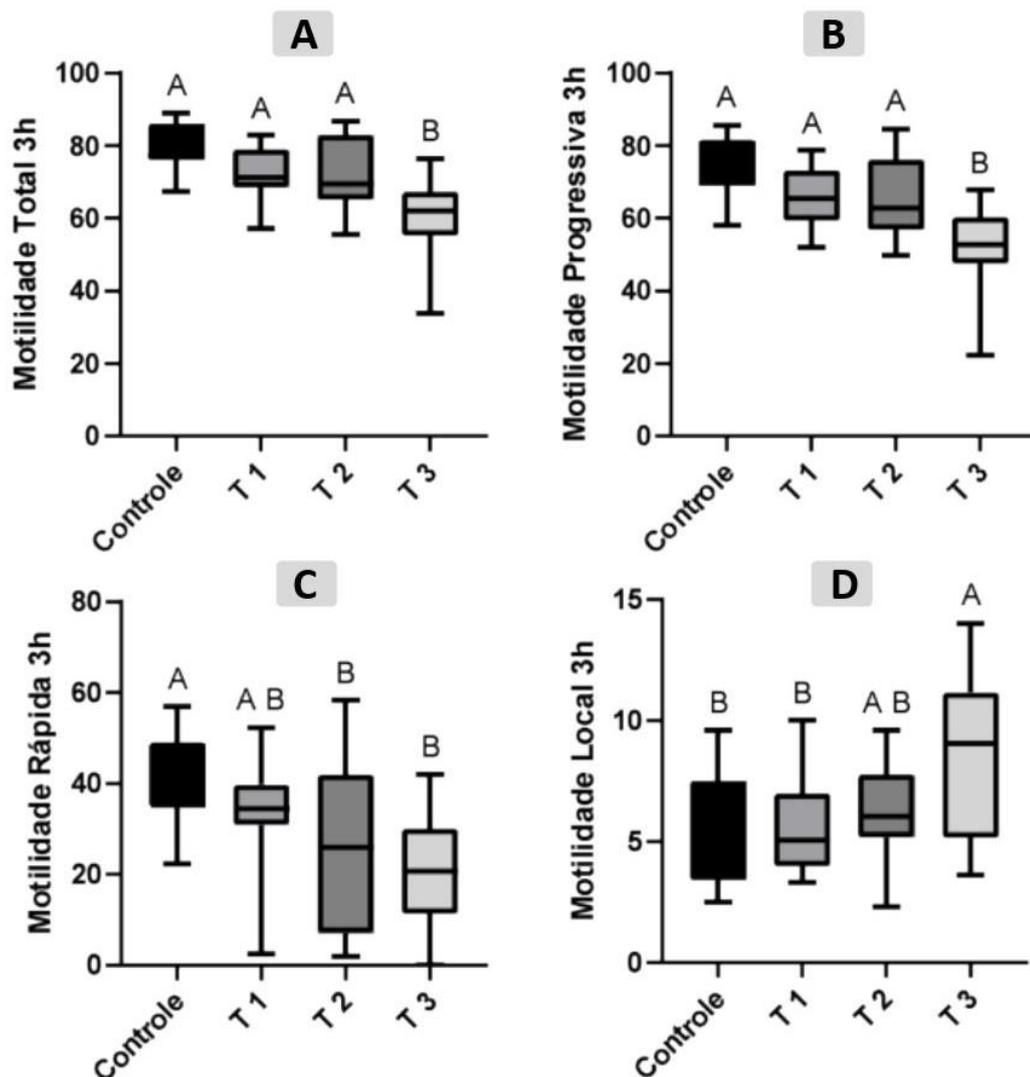
Abreviações: Grupo Controle do Leite Desnatado (LC), Leite Desnatado com a adição de 0,015% de H_3PO_4 (L1), Leite Desnatado com a adição de 0,03% de H_3PO_4 (L2), Leite Desnatado com a adição de 0,06% de H_3PO_4 (L3), Grupo Controle do Botusêmen (DC), Botusêmen com adição de 0,015% de H_3PO_4 (D1), Botusêmen com adição de 0,03% de H_3PO_4 (D2), Botusêmen com adição de 0,06% de H_3PO_4 (D3).

Experimento 2

De acordo com os dados apresentados nas figuras 3, 4 e 5 e das Tabelas 1, 2 e 3, foi observado que a adição de H₃PO₄ em meio diluente composto por leite desnatado UHT, para a refrigeração de sêmen equino, apresentou resultados significativamente inferiores ($P < 0,05$) no Tratamento 3, em comparação com o Grupo Controle e os demais tratamentos, desde o momento da primeira análise realizada em 3h, permanecendo assim até a última análise realizada em 48h.

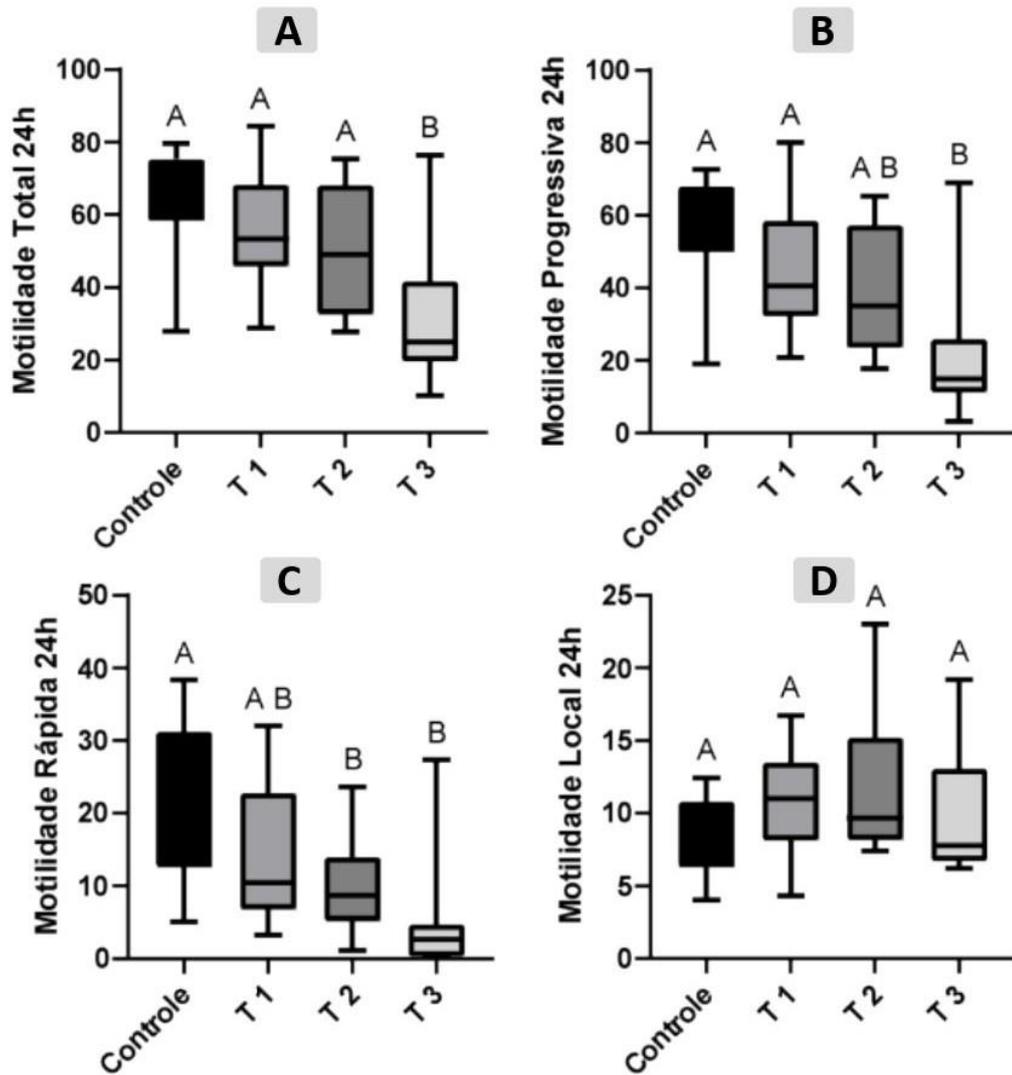
Nas análises outras análises realizadas, Teste Hiposmótico e Morfologia Espermática, não foram encontradas diferenças estatísticas entre nenhum grupo e em nenhum momento das avaliações.

Figura 3 – Box-plots dos resultados de Motilidade Total (A), Motilidade Progressiva (B), Motilidade Rápida (C) e Motilidade Local (D), da análise realizada três horas após a diluição do sêmen equino, com diferentes concentrações de H₃PO₄.



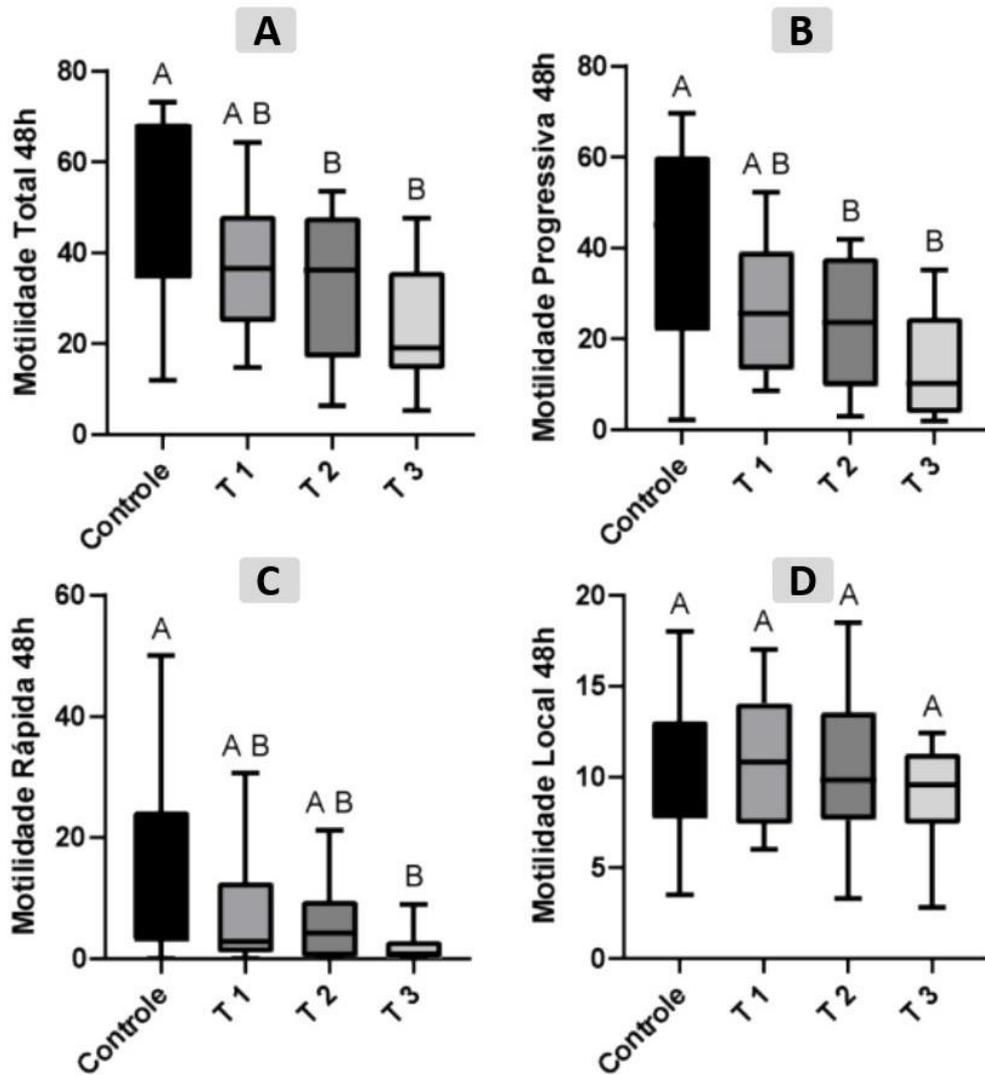
Abreviações: Grupo Controle (Controle), Tratamento 1 (T1), Tratamento (2), Tratamento (T3). As letras (A,B) indicam as diferenças significativas ($P < 0,05$).

Figura 4 – Box-plots dos resultados de Motilidade Total (A), Motilidade Progressiva (B), Motilidade Rápida (C) e Motilidade Local (D), da análise realizada vinte e quatro horas após a diluição do sêmen equino, com diferentes concentrações de H₃PO₄.



Abreviações: Grupo Controle (Controle), Tratamento 1 (T1), Tratamento (2), Tratamento (T3). As letras (A,B) indicam as diferenças significativas ($P < 0,05$).

Figura 5 – Box-plots dos resultados de Motilidade Total (A), Motilidade Progressiva (B), Motilidade Rápida (C) e Motilidade Local (D), da análise realizada quarenta e oito horas após a diluição do sêmen equino, com diferentes concentrações de H3PO4.



Abreviações: Grupo Controle (Controle), Tratamento 1 (T1), Tratamento (2), Tratamento (T3). As letras (A,B) indicam as diferenças significativas (P<0,05).

Tabela 1- Média e desvio padrão dos Grupos Controle, T1, T2 e T3, da análise realizada três horas após a diluição do sêmen equino, com diferentes concentrações de H₃PO₄.

3 h	Controle	T1	T2	T3
VCL [$\mu\text{m/s}$]	148,44 \pm 3,57 ^a	131,43 \pm 5,92 ^{ab}	119,43 \pm 5,07 ^{ab}	97,90 \pm 30,37 ^b
VSL [$\mu\text{m/s}$]	52,80 \pm 14,25 ^a	47,74 \pm 15,53 ^{ab}	41,93 \pm 18,27 ^{ab}	33,75 \pm 12,11 ^b
VAP [$\mu\text{m/s}$]	69,71 \pm 16,9 ^a	62,25 \pm 18,33 ^{ab}	55,77 \pm 22,83 ^{ab}	45,90 \pm 13,43 ^b
LIN	0,36 \pm 0,05 ^a	0,36 \pm 0,04 ^a	0,35 \pm 0,05 ^a	0,33 \pm 0,05 ^a
BCF [Hz]	21,58 \pm 3,43 ^a	18,95 \pm 4,72 ^{ab}	18,31 \pm 5,23 ^{ab}	15,34 \pm 3,55 ^b
STR	0,74 \pm 0,07 ^a	0,75 \pm 0,06 ^a	0,73 \pm 0,05 ^a	0,70 \pm 0,10 ^a
ALH [μm]	1,72 \pm 0,26 ^a	1,65 \pm 0,31 ^{ab}	1,44 \pm 0,35 ^{ab}	1,35 \pm 0,38 ^b

Abreviaturas: Velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$); Velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$); Velocidade da trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$); Linearidade (LIN, %); Frequência de batimento do flagelo (BCF, Hz); Retilinearidade (STR, %) e Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, $\mu\text{m/s}$). As letras (a,b) indicam as diferenças significativas ($P < 0,05$).

Tabela 2- Média e desvio padrão dos Grupos Controle, T1, T2 e T3, da análise realizada vinte e quatro horas após a diluição do sêmen equino, com diferentes concentrações de H₃PO₄.

24 h	Controle	T1	T2	T3
VCL [$\mu\text{m/s}$]	109,73 \pm 25,68 ^a	87,39 \pm 22,05 ^{ab}	79,42 \pm 19,10 ^{bc}	59,94 \pm 20,83 ^c
VSL [$\mu\text{m/s}$]	33,15 \pm 5,27 ^a	27,39 \pm 8,33 ^{ab}	24,80 \pm 7,72 ^b	16,35 \pm 8,54 ^c
VAP [$\mu\text{m/s}$]	47,54 \pm 10,97 ^a	37,49 \pm 12,05 ^{ab}	33,94 \pm 9,33 ^{bc}	24,93 \pm 9,14 ^c
LIN	0,31 \pm 0,06 ^a	0,31 \pm 0,07 ^a	0,30 \pm 0,06 ^a	0,25 \pm 0,05 ^a
BCF [Hz]	18,54 \pm 2,40 ^a	17,29 \pm 3,44 ^a	15,74 \pm 3,30 ^a	11,59 \pm 2,80 ^b
STR	0,69 \pm 0,07 ^a	0,70 \pm 0,06 ^a	0,68 \pm 0,07 ^a	0,58 \pm 0,11 ^b
ALH [μm]	1,36 \pm 0,34 ^a	1,12 \pm 0,28 ^{ab}	1,06 \pm 0,24 ^{ab}	0,91 \pm 0,26 ^b

Abreviaturas: Velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$); Velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$); Velocidade da trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$); Linearidade (LIN, %); Frequência de batimento do flagelo (BCF, Hz); Retilinearidade (STR, %) e Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, $\mu\text{m/s}$). As letras (a,b,c) indicam as diferenças significativas ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Média e desvio padrão dos Grupos Controle, sT1, T2 e T3, da análise realizada quarenta e oito horas após a diluição do sêmen equino, com diferentes concentrações de H₃PO₄.

48 h	Controle	T1	T2	T3
VCL [$\mu\text{m/s}$]	93,78 \pm 40,62 ^a	70,81 \pm 27,16 ^{ab}	68,17 \pm 26,79 ^{ab}	52,79 \pm 16,82 ^b
VSL [$\mu\text{m/s}$]	24,97 \pm 12,05 ^a	17,73 \pm 6,54 ^{ab}	17,60 \pm 7,29 ^{ab}	11,92 \pm 5,25 ^b
VAP [$\mu\text{m/s}$]	40,28 \pm 18,10 ^a	28,57 \pm 11,50 ^{ab}	27,94 \pm 11,31 ^{ab}	21,46 \pm 6,71 ^b
LIN	0,25 \pm 0,05 ^a	0,24 \pm 0,05 ^a	0,24 \pm 0,05 ^a	0,21 \pm 0,04 ^a
BCF [Hz]	14,03 \pm 3,18 ^a	12,85 \pm 2,14 ^{ab}	12,60 \pm 1,92 ^{ab}	10,44 \pm 1,39 ^b
STR	0,59 \pm 0,09 ^a	0,59 \pm 0,07 ^a	0,58 \pm 0,09 ^a	0,51 \pm 0,08 ^a
ALH [μm]	1,31 \pm 0,55 ^a	1,03 \pm 0,37 ^{ab}	0,99 \pm 0,37 ^{ab}	0,82 \pm 0,24 ^b

Abreviaturas: Velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$); Velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$); Velocidade da trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$); Linearidade (LIN, %); Frequência de batimento do flagelo (BCF, Hz); Retilinearidade (STR, %) e Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, $\mu\text{m/s}$). As letras (a,b) indicam as diferenças significativas ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

No experimento 1, verificamos que o botusemen é inviável para a adição de ácido fosfórico (H₃PO₄) nas concentrações de 0,015%, 0,03% e 0,06%, pois ocorreu uma rápida aglutinação após a adição de H₃PO₄, provavelmente devido a ação tamponante estar próxima da saturação, chegando a saturação no momento da adição, acidificando fortemente o meio, o que torna inviável a sobrevivência espermática.

O leite desnatado UHT demonstrou ser um ótimo diluente para refrigeração de sêmen equino, pois teve uma boa manutenção da viabilidade seminal, como demonstrado anteriormente por Batellier *et al.* (1998); Pagl *et al.* (2006); Recková *et al.* (2022). Os resultados obtidos em relação às motilidades espermáticas, as quais têm uma forte correlação positiva com a fertilidade (Cox *et al.*, 2006; Arruda *et al.*, 2007), demonstraram não haver melhora nas diferentes concentrações utilizadas de H₃PO₄, em relação ao grupo controle.

Todos os ganhões do presente estudo, apresentavam motilidade total e análise morfológica, superiores a 60% em ambas variáveis na primeira análise realizada 3h (T1),

Recková *et al.* (2022) e o colégio brasileiro de reprodução animal (CBRA, 2013) relatam ser os requisitos mínimos para o sêmen fresco de garanhões.

Os resultados de MT e MP, do grupo controle e dos tratamentos 1 e 2, foram semelhantes aos encontrados por Recková *et al.* (2022), em análises realizadas às 0h, 24h e 48h, apresentando um decréscimo esperado ao longo do tempo de armazenamento (Tharasanit *et al.*, 2007; Lefrapper; Walston; Whisnant, 2010; Novello *et al.*, 2020).

Houve piora na MT, MP, MR, ML, VCL, VSL, VAP, BCF e ALH no Tratamento 3 já na primeira análise se comparando aos outros grupos, sugerindo que a concentração de 0,06% de H₃PO₄ no diluente apresenta uma ação deletéria ao acondicionamento do sêmen equino. O que se manteve durante as outras duas análises realizadas com 24h e 48h após diluição das amostras. Essas reduções podem ser em decorrência da acidificação do meio, aonde chegou ao valor de pH de 6,1, visto que há uma relação do pH relativamente baixo dentro da cauda do epidídimo e a quiescência espermática (Carr; Acott, 1989). Espermatozoides de Ouriço-dormar são armazenados no fluido seminal dentro do testículo por vários meses em um estado inativo devido a um baixo pH (Lee; Johnson; Epel, 1983). Carr; Acott (1989), demonstraram que a motilidade de espermatozoides bovinos pode ser inibida reversivelmente pela depressão do pH, com uma variedade de ácidos fracos, no entanto, após exposição prolongada a condições usadas para imobilizar completamente os espermatozoides (Lactato ou piruvato, pH 5,5) não foi possível reverter a motilidade (Acott; Carr, 1984). Gadea (2003) corrobora com essa hipótese, afirmando que reduzindo o pH do sêmen, conseqüentemente, há uma redução do metabolismo e da motilidade espermática. Em contrapartida, Wendt *et al.* (2002), demonstrou não haver diferença em MT, MP, VSL, LIN e STR na faixa etária de pH entre 6,4 e 7,2, com valor inferior de pH (6,4) semelhante aos tratamentos 2 (6,34) e 3 (6,33) do presente estudo.

A competência espermática necessária para fecundar o oócito é obtida através de um fenômeno denominado, capacitação espermática, o qual deve ocorrer durante a passagem no trato reprodutivo da fêmea (Satouh; Ikawa, 2018). Porém o processo que ocorre durante a refrigeração, pode causar capacitação espermática prematura, o que é indesejável, sendo potencialmente prejudicial à fertilidade (Loomis, 1992; Cormier *et al.*, 1997; Bailey *et al.*, 2003; Pons-Rejraji *et al.*, 2009; Setyawan *et al.*, 2016). Tratamentos que impeçam o aumento do pH também impedem que aumente a capacitação espermática (Parrish; Susko-Parrish; First, 1989), sendo possível uma modulação da capacitação através de ajustes de pH em meio diluente (Wendt *et al.*, 2002), com isso valores baixos de pH, como os utilizados nas soluções

deste estudo, podem ser benéficos para a redução da capacitação espermática prematura, causada durante a refrigeração.

Mudanças nos padrões de movimento dos espermatozoides podem sinalizar o início antecipado da capacitação espermática (Celeghini *et al.*, 2017). A redução da VCL e ALH, vista no presente estudo, pode ter uma correlação positiva com a redução da hiperativação espermática, modificação marcante de batimento flagelar, que ocorre na capacitação espermática, visto que o aumento de ambas é característica da hiperativação em espermatozoides equinos (Rathi *et al.*, 2010). Coincidindo com Arruda (2000), que relata uma qualidade espermática inferior relacionada a um maior valor de ALH. O deslocamento lateral de cabeça, causado na capacitação é indesejável, visto que o mesmo pode interferir na progressão do espermatozóide do trato reprodutivo da fêmea (Celeghini *et al.*, 2017). Bueno *et al.* (2020), relatou um decréscimo de ALH em sêmen de garanhões da raça crioula, após a criopreservação, técnica essa que assim como a refrigeração, causa capacitação espermática prematura (Fuller; Whittingham, 1996).

A adição de ácido fosfórico, nas concentrações de 0,015%, 0,03% e 0,06%, associadas ao leite desnatado UHT, como meio enriquecedor para diluentes de sêmen equino refrigerado, não apresentaram benefícios em prolongar ou melhorar a viabilidade espermática. Uma hipótese, referente às altas concentrações de ácido fosfórico no plasma seminal de equinos (Bueno, 2023) e touros (Velho *et al.*, 2018), é que o ácido fosfórico é um subproduto da reação que libera energia para a motilidade espermática, através da quebra de uma molécula de pirofosfato inorgânico (PPi), processo que libera energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), a qual é utilizada para a motilidade espermática e para a função do acrossomal durante a penetração na zona pelúcida (Wallach; Revel, 1980; Lundin; Baltscheffsky; Ronne, 1991; Velho *et al.*, 2018). Com isso, estudos futuros devem ser realizados, a fim de compreender os mecanismos relacionados aos processos e/ou causas da reação de hidrólise de ATP provenientes do pirofosfato inorgânico.

CONCLUSÃO

A adição de ácido fosfórico no diluente, nas concentrações testadas, não se mostrou eficiente em melhorar a qualidade seminal com sêmen refrigerado. Porém foi demonstrado que o Tratamento 1 nas avaliações realizadas, não difere do Grupo Controle, indicando ausência de prejuízos a célula espermática.

Este estudo fornece informações sobre a utilização de aditivos no diluente para semen equino, buscando ferramentas de otimização da conservação de sêmen e avanço nas técnicas de inseminação artificial. Os resultados da adição do ácido fosfórico demonstram a necessidade de futuros estudos para direcionar alternativas que possam oferecer melhores resultados nesta biotécnica.

REFERÊNCIAS

- ACOTT, Ted S.; CARR, Daniel W. Inhibition of Bovine Spermatozoa by Caudal Epididymal Fluid: II. Interaction of pH and a Quiescence Factor¹. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 926–935, 1984.
- AURICH, Christine. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 89, n. 1, Special Issue: Proceedings of the 4th International Symposium on Stallion Reproduction, p. 65–75, 2005.
- AURICH, C. Semen extenders for cooled semen (Europe). **Equine Reproduction**, 2nd edn., Eds: A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala and D.D. Varner, Wiley-Blackwell, Chichester, UK. pp 1336-1340, 2011.
- BAILEY, J.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. **Canadian Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 393–401, 2003.
- BATELLIER, F *et al.* Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15°C under aerobic conditions. **Theriogenology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 229–236, 1998.
- BRINSKO, S.P. Semen extenders for cooled semen (North America). **Equine Reproduction**, 2nd edn., Eds: A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala and D.D. Varner, Wiley-Blackwell, Chichester, UK. pp 1341-1343, 2011.
- BUENO, Verônica La Cruz *et al.* Características seminais pós-descongelamento em garanhões da raça crioula. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 44, n. 3, p. 100-107, 2020.
- BUENO, Verônica La Cruz. Proteômica e metabolômica do plasma seminal equino. [s. l.], 2023. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/263299>. Acesso em: 18 jun. 2024.
- CARR, Daniel W.; ACOTT, Ted S. Intracellular pH Regulates Bovine Sperm Motility and Protein Phosphorylation¹. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 907–920, 1989.
- CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3. ed. Belo Horizonte: 2013. 87p.
- CELEGHINI, Eneiva Carla Carvalho *et al.* Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 40-45, 2017.

CORMIER, Nathaly; SIRARD, MARC-ANDRÉ; BAILEY, Janice L. Premature Capacitation of Bovine Spermatozoa Is Initiated by Cryopreservation. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 461–468, 1997.

COX, J. F. *et al.* Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 860–867, 2006.

DEEPINDER, Fnu; CHOWDARY, Hyndhavi T.; AGARWAL, Ashok. Role of metabolomic analysis of biomarkers in the management of male infertility. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 351–358, 2007.

FAKIH, H. *et al.* Enhancement of human sperm motility and velocity in vitro: effects of calcium and creatine phosphate. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 938–944, 1986.

FULLER, S. J.; WHITTINGHAM, D. G. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. [s. l.], 1996. Disponível em: https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/108/1/jrf_108_1_020.xml. Acesso em: 17 ago. 2024.

GADEA, Joaquin. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 17-27, 2003.

GILANY, Kambiz *et al.* Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 84–86, 2014.

GILANY, Kambiz *et al.* Untargeted metabolomic profiling of seminal plasma in nonobstructive azoospermia men: A noninvasive detection of spermatogenesis. **Biomedical chromatography: BMC**, [s. l.], v. 31, n. 8, 2017.

HAMAMAH, S. *et al.* ¹H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. **Journal of Reproduction and Fertility**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 51–55, 1993.

HAMAMAH, S. *et al.* Quantification by magnetic resonance spectroscopy of metabolites in seminal plasma able to differentiate different forms of azoospermia. **Human Reproduction (Oxford, England)**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 132–135, 1998.

HINRICHS, Katrin. Assisted reproduction techniques in the horse. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 80, 2013.

ISHIGAKI, Mika; HOSHINO, Yumi; OZAKI, Yukihiro. Phosphoric acid and phosphorylation levels are potential biomarkers indicating developmental competence of matured oocytes. **The Analyst**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 1527–1534, 2019.

JASKO, D. J. Evaluation of stallion semen. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 129–148, 1992.

KOVAC, Jason R.; PASTUSZAK, Alexander W.; LAMB, Dolores J. The use of genomics, proteomics and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertility and sterility**, [s. l.], v. 99, n. 4, p. 998–1007, 2013.

KUMAR, Ajeet *et al.* Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: ¹H nuclear magnetic resonance analysis. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 123–131, 2015.

LAGARES, M. A. *et al.* Preservação do sêmen fresco equino: avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 26, n. 1, p. 29-42, 1998.

LEE, Hon cheung; JOHNSON, Carl; EPEL, David. Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 31–45, 1983.

LEFRAPPER, L.; WALSTON, L.; WHISNANT, C.S. Comparison of Various Extenders for Storage of Cooled Stallion Spermatozoa for 72 Hours. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 200–204, 2010.

LOOMIS, P.R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: Proceedings of the annual convention of the **American Association of Equine Practitioners** (USA). 1992.

LOVE, Charles C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 89, n. 1, Special Issue: Proceedings of the 4th International Symposium on Stallion Reproduction, p. 39–45, 2005.

LUNDIN, M.; BALTSCHIEFFSKY, H.; RONNE, H. Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 266, n. 19, p. 12168–12172, 1991.

NOVELLO, Guilherme *et al.* Stallion Semen Cooling Using Native Phosphocaseinate-based Extender and Sodium Caseinate Cholesterol-loaded Cyclodextrin-based Extender. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 92, p. 103104, 2020.

PAGL, Roland *et al.* Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. **Theriogenology**, [s. l.], v. 66, n. 5, p. 1115–1122, 2006.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin: Inhibitory Effect of Glucose and Role of Intracellular pH1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 683–699, 1989.

PICKETT, B W *et al.* Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and sterility**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 167–174, 1975.

PONS-REJRAJI, Hanae; BAILEY, Janice L.; LECLERC, Pierre. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 525–537, 2009.

QIAO, Shanlei *et al.* Seminal plasma metabolomics approach for the diagnosis of unexplained male infertility. **PloS One**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. e0181115, 2017.

RATHI, Rahul *et al.* Evaluation of In Vitro Capacitation of Stallion Spermatozoa1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 462–470, 2001.

REČKOVÁ, Zuzana *et al.* The efficiency of different types of extenders for semen cooling in stallions. **Animal Bioscience**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 670–676, 2022.

SATOUH, Yuhkoh; IKAWA, Masahito. New Insights into the Molecular Events of Mammalian Fertilization. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. 818–828, 2018.

SETYAWAN, Erif Maha Nugraha *et al.* Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 479, n. 4, p. 927–932, 2016.

SIEME, Harald; DISTL, Ottmar. Genomics and Fertility in Stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 32, n. 8, 6th International Symposium on Stallion Reproduction, p. 467–470, 2012.

TANG, B. *et al.* Metabonomic analysis of fatty acids in seminal plasma between healthy and asthenozoospermic men based on gas chromatography mass spectrometry. **Andrologia**, [s. l.], v. 49, n. 9, 2017.

THARASANIT, Theerawat *et al.* The effect of cold storage on the quality of stallion semen and pregnancy rate after artificial insemination. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 4, p. 39–48, 2007.

VARNER, Dickson D. *et al.* Semen Processing for the Subfertile Stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 677–685, 2008.

VELHO, Ana Luiza Cazaux *et al.* Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. e0195279, 2018.

VIDAMENT, M. *et al.* Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. **Theriogenology**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 907–917, 1997.

WALLACH, David; REVEL, Michel. An interferon-induced cellular enzyme is incorporated into virions. **Nature**, [s. l.], v. 287, n. 5777, p. 68–70, 1980.

WOOD, Paul L. *et al.* Lipidomics of equine sperm and seminal plasma: Identification of amphiphilic (O-acyl)- ω -hydroxy-fatty acids. **Theriogenology**, [s. l.], v. 86, n. 5, p. 1212–1221, 2016.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo buscou investigar os efeitos da adição de ácido fosfórico (H_3PO_4) no diluente de leite desnatado UHT na refrigeração de sêmen equino, com o objetivo de melhorar a qualidade seminal e, conseqüentemente, a eficiência reprodutiva dos garanhões. Os resultados demonstraram que, embora o leite desnatado UHT seja um diluente amplamente utilizado devido ao seu baixo custo e eficácia, a adição de ácido fosfórico em diferentes concentrações (0,015%, 0,03% e 0,06%) não contribuiu para a melhoria da viabilidade espermática. De outro modo, observou-se que a adição de 0,06% de ácido fosfórico teve um efeito negativo significativo em MT, MP, MR, ML, VCL, VSL, VAP, BCF e ALH, possivelmente resultante da acidificação do meio em questão, causando impactos relevantes na sobrevivência espermática. Esses resultados indicam que o ácido fosfórico, nas concentrações estudadas, não é um coadjuvante eficaz para prolongar ou melhorar a qualidade do sêmen equino durante o processo de refrigeração.

Futuros estudos são essenciais para desvendar os mecanismos bioquímicos oriundos da hidrólise de ATP originária das moléculas de pirofosfato inorgânico. Sendo possível um novo estudo com a adição de pirofosfato inorgânico no diluente de refrigeração de sêmen equino, com o intuito de haver a hidrólise da molécula e liberação de ATP para o meio ao qual o espermatozoide era se beneficiar nesta energia.

Este estudo representou um grande desafio, mas também foi uma experiência extremamente enriquecedora, contribuindo de maneira significativa para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Ao longo deste experimento, realizei uma vasta quantidade de análises, proporcionando um treinamento grandioso ao longo dos dias. Foram conduzidas mais de 144 avaliações de cada variável, resultando na avaliação de 14.400 células por meio de análises morfológicas e do teste hiposmótico, perfazendo um total de mais de 28.800 células espermáticas avaliadas individualmente com microscopia óptica durante o estudo. Além disso, aperfeiçoei uma vasta variedade de técnicas laboratoriais, como a realização de esfregaços e colorações, cujas melhorias se tornaram evidentes ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS

- ACOTT, Ted S.; CARR, Daniel W. Inhibition of Bovine Spermatozoa by Caudal Epididymal Fluid: II. Interaction of pH and a Quiescence Factor1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 926–935, 1984.
- ARRUDA, Rubens Paes de et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.
- AURICH, Christine. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 89, n. 1, Special Issue: Proceedings of the 4th International Symposium on Stallion Reproduction, p. 65–75, 2005.
- AURICH, C. Semen extenders for cooled semen (Europe). **Equine Reproduction**, 2nd edn., Eds: A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala and D.D. Varner, Wiley-Blackwell, Chichester, UK. pp 1336-1340, 2011.
- BAILEY, J.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. **Canadian Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 393–401, 2003.
- BARUFFALDI, Renato; OLIVEIRA, Maricê Nogueira de. Fundamentos de tecnologia de alimentos. [s. l.], 1998. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001021562>. Acesso em: 29 jun. 2024.
- BATELLIER, F *et al.* Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 68, n. 3–4, p. 181–190, 2001.
- BATELLIER, F *et al.* Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15°C under aerobic conditions. **Theriogenology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 229–236, 1998.
- BERGERON, Annick; MANJUNATH, Puttaswamy. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 73, n. 10, p. 1338–1344, 2006.
- BIENIEK, Jared M.; DRABOVICH, Andrei P.; LO, Kirk C. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 426, 2016.
- BRAUNDMEIER, A. G. *et al.* The relationship of porcine sperm zona-binding ability to fertility. **Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 452–458, 2004.
- BRINSKO, S.P. Semen extenders for cooled semen (North America). **Equine Reproduction**, 2nd edn., Eds: A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala and D.D. Varner, Wiley-Blackwell, Chichester, UK. pp 1341-1343, 2011.
- BUENO, Verônica La Cruz et al. Características seminais pós-descongelamento em garanhões da raça crioula. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 44, n. 3, p. 100-107, 2020.

BUENO, Verônica La Cruz. Proteômica e metabolômica do plasma seminal equino. [s. l.], 2023. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/263299>. Acesso em: 18 jun. 2024.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. In: Symposium Internationale de Zootechnie, 7, 1972, Milano, Italy. Proceedings... Milano: SIZ, 1972.

CANTON, Helen. Food and agriculture organization of the United Nations—FAO. In: **The Europa directory of international organizations 2021**. Routledge, 2021. p. 297-305.

CARR, Daniel W.; ACOTT, Ted S. Intracellular pH Regulates Bovine Sperm Motility and Protein Phosphorylation. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 907–920, 1989.

CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3. ed. Belo Horizonte: 2013. 87p.

CELEGHINI, Eneiva Carla Carvalho et al. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 40-45, 2017.

CENTOLA, G. M. Comparison of Manual Microscopic and Computer-Assisted Methods for Analysis of Sperm Count and Motility. **Archives of Andrology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1–7, 1996.

CORMIER, Nathaly; SIRARD, MARC-ANDRÉ; BAILEY, Janice L. Premature Capacitation of Bovine Spermatozoa Is Initiated by Cryopreservation. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 461–468, 1997.

COX, J. F. *et al.* Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 860–867, 2006.

CUERVO-ARANGO, Juan *et al.* The Effect of Storage Temperature of Stallion Semen on Pregnancy Rates. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 35, n. 7, p. 611–616, 2015.

DEEPINDER, Fnu; CHOWDARY, Hyndhavi T.; AGARWAL, Ashok. Role of metabolomic analysis of biomarkers in the management of male infertility. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 351–358, 2007.

FAKIH, H. *et al.* Enhancement of human sperm motility and velocity in vitro: effects of calcium and creatine phosphate. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 938–944, 1986.

FAZELI, A. R. *et al.* Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. **The Veterinary Record**, [s. l.], v. 132, n. 1, p. 14–16, 1993.

FAZELI, A. R. *et al.* Relation between stallion sperm binding to homologous hemizonae and fertility. **Theriogenology**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 751–760, 1995.

Freitas M, Boures CS, Jos Gonaves de Oliveira F, Oliveira RA. The effect of skim milk as an equine semen extender. In : Proceedings of the ADSA-ASAS-CSAS Joint Annual Meeting; 2014 July 20–4; Kansas City, MO, USA.

FULLER, S. J.; WHITTINGHAM, D. G. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. [s. l.], 1996. Disponível em: https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/108/1/jrf_108_1_020.xml. Acesso em: 17 ago. 2024.

GADEA, Joaquin. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 17-27, 2003.

GARRETT, C.; LIU, D. Y.; BAKER, H. W. Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphometry. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 362–371, 1997.

GHORBANI, B. *et al.* Effect of selenium nanoparticles-supplemented INRA96 extender on Turkmen stallion sperm quality and lipid peroxidation during storage at 5°C. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 136, p. 105073, 2024.

GILANY, Kambiz *et al.* Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 84–86, 2014.

GILANY, Kambiz *et al.* Untargeted metabolomic profiling of seminal plasma in nonobstructive azoospermia men: A noninvasive detection of spermatogenesis. **Biomedical chromatography: BMC**, [s. l.], v. 31, n. 8, 2017.

GOODACRE, Royston *et al.* Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 245–252, 2004.

GRAHAM, J. Principles of cooled semen. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. **Equine Reproduction**. 2nd ed. WileyBlackwell; 2011. p. 1308–15.

HAMAMAH, S. *et al.* 1H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. **Journal of Reproduction and Fertility**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 51–55, 1993.

HAMAMAH, S. *et al.* Quantification by magnetic resonance spectroscopy of metabolites in seminal plasma able to differentiate different forms of azoospermia. **Human Reproduction (Oxford, England)**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 132–135, 1998.

HEISKANEN, M. -L. *et al.* Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for 70 or 80 hours. **Theriogenology**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 1043–1051, 1994.

HERNÁNDEZ-AVILÉS, Camilo *et al.* A matter of agreement: The effect of the technique and evaluator on the analysis of morphologic defects in stallion sperm. **Theriogenology**, [s. l.], v. 202, p. 74–83, 2023.

HIGNETT, Travis P. Fertilizers Derived from Phosphoric Acid. In: HIGNETT, Travis P. (org.). **Fertilizer Manual**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1985. p. 187–202. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-017-1538-6_14. Acesso em: 30 jun. 2024.

HINRICHS, Katrin. Assisted reproduction techniques in the horse. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 80, 2013.

HOOGEWIJS, M. *et al.* Validation and usefulness of the Sperm Quality Analyzer V equine for equine semen analysis. **Theriogenology**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 189–194, 2011.

ISHIGAKI, Mika; HOSHINO, Yumi; OZAKI, Yukihiro. Phosphoric acid and phosphorylation levels are potential biomarkers indicating developmental competence of matured oocytes. **The Analyst**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 1527–1534, 2019.

IVANOVA, M.; MOLLOVA, M. Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. **Theriogenology**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 397–410, 1993.

JANUSKAUSKAS, A. *et al.* Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in sweden. **Theriogenology**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 641–658, 1999.

JASKO, D. J. *et al.* Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 1241–1252, 1992.

JASKO, D. J. Evaluation of stallion semen. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 129–148, 1992.

JOHNSON, Wilbur *et al.* Safety Assessment of Phosphoric Acid and Its Salts as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, [s. l.], v. 40, n. 1_suppl, p. 34S-85S, 2021.

JONES, J. M.; BAVISTER, B. D. Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 616–624, 2000.

KANKOFER, Marta *et al.* Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. **Theriogenology**, [s. l.], v. 63, n. 5, p. 1354–1365, 2005.

KATILA, Terttu. Containers for transport of equine semen. *In*: MCKINNON, AO *et al.* (org.). **Equine Reproduction**. [S. l.]: Wiley Blackwell, 2011. p. 1330–1335.

KENNEY, R. M. *et al.* Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. 1976.

KOVAC, Jason R.; PASTUSZAK, Alexander W.; LAMB, Dolores J. The use of genomics, proteomics and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertility and sterility**, [s. l.], v. 99, n. 4, p. 998–1007, 2013.

KOWALCZYK, Alicja; CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, Ewa; KUCZAJ, Marian. Factors Influencing the Popularity of Artificial Insemination of Mares in Europe. **Animals**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 460, 2019.

KUMAR, Ajeet *et al.* Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: 1H nuclear magnetic resonance analysis. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 123–131, 2015.

LAGARES, M. A. et al. Preservação do sêmen fresco equino: avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 26, n. 1, p. 29-42, 1998.

LEE, Hon cheung; JOHNSON, Carl; EPEL, David. Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 31–45, 1983.

LEFRAPPER, L.; WALSTON, L.; WHISNANT, C.S. Comparison of Various Extenders for Storage of Cooled Stallion Spermatozoa for 72 Hours. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 200–204, 2010.

LOVE, Charles C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 89, n. 1, Special Issue: Proceedings of the 4th International Symposium on Stallion Reproduction, p. 39–45, 2005.

LOOMIS, P.R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: Proceedings of the annual convention of the **American Association of Equine Practitioners** (USA). 1992.

LUNDIN, M.; BALTSCHIEFFSKY, H.; RONNE, H. Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 266, n. 19, p. 12168–12172, 1991.

MACIEL, Alisson Ceccato *et al.* Viability of Equine Semen Stored in a Polyethylene System for Transport for Eight Hours. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 45, p. 6–6, 2017.

MAMICA, O; Havlíčková, T; Rečková, Z. Analysis of stallion sperm survival in refrigerated insemination doses using different types of sperm diluents. In : Proceedings of the **Current problems of horse breeding** in the Czech Republic; Brno, Czech Republic. 8:p. 112019. Sobotková, E: Mendel University in Brno; 2019.

MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. **Animal Reproduction (AR)**, v. 9, n. 4, p. 809-815, 2018.

MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. 2016.

MAREE, L. *et al.* Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. **Human Reproduction (Oxford, England)**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1369–1382, 2010.

MENEZES, E. B. *et al.* Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 714, 2019.

MENKVELD, Roelof. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 47–58, 2010.

MENKVELD, Roelof *et al.* Relationship between human sperm morphology and acrosomal function. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 432–438, 2003.

MEYERS, S. A. *et al.* Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: comparisons between fertile and subfertile stallions. **Theriogenology**, [s. l.], v. 46, n. 7, p. 1277–1288, 1996.

MICHAJILOV, N. N. Sperm dilution in the milk. **The Czechoslovak Vet. Mag.(Jan. 10, 1950), Abstracts J. Am. Vet. Med. Assoc**, v. 117, p. 337, 1950.

MORAES, Kalinne D'Avila Apolinario de. Determinação do teor de ácido fosfórico em refrigerantes cola. [s. l.], 2015. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/8942>. Acesso em: 29 jun. 2024.

NEILD, D *et al.* Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 721–727, 1999.

NOVELLO, Guilherme *et al.* Stallion Semen Cooling Using Native Phosphocaseinate-based Extender and Sodium Caseinate Cholesterol-loaded Cyclodextrin-based Extender. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 92, p. 103104, 2020.

PAGL, Roland *et al.* Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. **Theriogenology**, [s. l.], v. 66, n. 5, p. 1115–1122, 2006.

PALMER E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. Proc. 10th Int Congr **Anim Reprod Artif Insem**. 1984;3:377 abstr.

PANTKE, P. *et al.* Development of a Zona Pellucida Sperm Binding Assay for the Assessment of Stallion Fertility1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 52, n. monograph_series1, p. 681–687, 1995.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin: Inhibitory Effect of Glucose and Role of Intracellular pH1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 683–699, 1989.

PENINO, Nicolas Cazales. Butafosfan e vitamina B12 no sêmen fresco e refrigerado de garanhões. [s. l.], 2013. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/83490>. Acesso em: 01 ago. 2024.

PERREAULT, Sally D. Special Section on Challenging Assumptions About the Meaning of Sperm Concentration and Sperm Counts. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 621–622, 2009.

PICKETT, B W *et al.* Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and sterility**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 167–174, 1975.

PONS-REJRAJI, Hanae; BAILEY, Janice L.; LECLERC, Pierre. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 525–537, 2009.

QIAO, Shanlei *et al.* Seminal plasma metabolomics approach for the diagnosis of unexplained male infertility. **PloS One**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. e0181115, 2017.

RATHI, Rahul *et al.* Evaluation of In Vitro Capacitation of Stallion Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 462–470, 2001.

REČKOVÁ, Zuzana *et al.* The efficiency of different types of extenders for semen cooling in stallions. **Animal Bioscience**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 670–676, 2022.

RURAL, Compre. Conheça os países com as maiores populações de equinos do mundo — CompreRural. In: CONTEÚDO E NOTÍCIAS DO AGRONEGÓCIO BRASILEIRO | COMPRERURAL. 12 maio 2023. Disponível em: <https://www.comprerural.com/conheca-os-paises-com-as-maiores-populacoes-de-equinos-do-mundo/>. Acesso em: 18 ago. 2024.

SAACKE, R. G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. **Theriogenology**, [s. l.], v. 70, n. 3, Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology, p. 473–478, 2008.

SATOUH, Yuhkoh; IKAWA, Masahito. New Insights into the Molecular Events of Mammalian Fertilization. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. 818–828, 2018.

SETYAWAN, Erif Maha Nugraha *et al.* Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 479, n. 4, p. 927–932, 2016.

SIEME, Harald; DISTL, Ottmar. Genomics and Fertility in Stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 32, n. 8, 6th International Symposium on Stallion Reproduction, p. 467–470, 2012.

SILVA, Marco A. Coutinho da *et al.* Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zona pellucida. [s. l.], 2012. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/143/5/577.xml>. Acesso em: 18 jun. 2024.

TANG, B. *et al.* Metabonomic analysis of fatty acids in seminal plasma between healthy and asthenozoospermic men based on gas chromatography mass spectrometry. **Andrologia**, [s. l.], v. 49, n. 9, 2017.

THARASANIT, Theerawat *et al.* The effect of cold storage on the quality of stallion semen and pregnancy rate after artificial insemination. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 4, p. 39–48, 2007.

TRENTIN, Janislene Mach. Tampões em diluentes para resfriamento de sêmen equino. [s. l.], 2014. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/102610>. Acesso em: 5 jul. 2024.

VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 448–462, 2008.

VARNER, Dickson D. *et al.* Semen Processing for the Subfertile Stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 677–685, 2008.

VELHO, Ana Luiza Cazaux *et al.* Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. e0195279, 2018.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 149–179, 2002.

VIDAMENT, M. *et al.* Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. **Theriogenology**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 907–917, 1997.

VON BURG, R. Toxicology update. **Journal of Applied Toxicology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 301–303, 1992.

WALLACH, David; REVEL, Michel. An interferon-induced cellular enzyme is incorporated into virions. **Nature**, [s. l.], v. 287, n. 5777, p. 68–70, 1980.

WENDT, K.M. *et al.* Effect of extender pH on motility characteristics of cool-stored equine spermatozoa. **Theriogenology**, [s. l.], v. 58, p. 321–324, 2002.

WOOD, Paul L. *et al.* Lipidomics of equine sperm and seminal plasma: Identification of amphiphilic (O-acyl)- ω -hydroxy-fatty acids. **Theriogenology**, [s. l.], v. 86, n. 5, p. 1212–1221, 2016.

YÁNIZ, J.L.; MATEOS, J.A.; SANTOLARIA, P. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15°C. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 54–60, 2011.

YI, Young-Joo *et al.* Identification of the inorganic pyrophosphate metabolizing, ATP substituting pathway in mammalian spermatozoa. **PloS One**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. e34524, 2012.